

腫瘍分子生物学研究分野

<研究スタッフ>

教授：高橋智聡

助教：木戸敬治 Shamma Awad

博士研究員：北嶋俊輔

技能補佐員：鈴木美砂

<研究概要>

臨床的レリバンスが豊富ながん遺伝子・がん抑制遺伝子を変異させた細胞やマウスを中心に、シンプルで分子生物学的・遺伝学的な解析がしやすい *in vivo*・*in vitro* がんモデル系を組み立て、発がんや転移、がん幹細胞等の悪性形質を克服するための標的になる新規パスウェイを探索する。現在の主要課題は以下の通り。

- 1) Rb(retinoblastoma)がん抑制遺伝子の新規機能の解明
- 2) *in vitro* がん幹細胞モデル系の開発
- 3) メタロプロテアーゼ制御因子 RECK のがん抑制作用の解明

<2010 年度の成果、進行状況と今後の計画>

1. Rb 不活性化によって誘導される DNA 損傷応答と細胞老化

Rb 不活性化を含む Rb 経路の異常は、進行がんの 9 割以上において観察される。Rb 不活性化による発がんが、Ras 蛋白質の成熟促進によって誘導される細胞老化によって拮抗されることを昨年度発表した。Rb 不活性化によって生じる早期 C 細胞腫瘍では、細胞老化の誘導に先立って DNA 損傷応答が観察される。本年度は、Rb-ATM 二重欠損マウスを解析し、DNA 損傷応答が細胞老化の誘導に必須であることを遺伝学的に証明した。ついで、その分子機序を探索、少なくとも Rb 不活性というコンテキストでは、ATM が、p16Ink4a 遺伝子のエピジェネティックな転写制御に関わることを見出した。DNA 損傷応答と細胞老化のつながり目と考え、この機序を更に探索している。このような研究によって、がん抑制遺伝子不活性化による発がんに対抗する生体防御機構を明らかにすることにより、発がん制御の方策を探ることができると考える。

2. Rb 機能と AKT 経路

Rb 不活性化は、がんのイニシエーションよりもむしろプログレッションにおいて高頻度に観察される。この意義はなんだろうか？本年度は、Rb が AKT の特定部位のリン酸化を制御する機能に強く注目した。このパスウェイは、がん細胞の lipogenic phenotype や stemness 獲得に関与する可能性があると考え、その機序の解明と、出口となる生物学的現象の同定を、様々な複合変異マウスや細胞を用いて行っている。

3. Rb 機能とがんの幹細胞様振る舞い

Rb ファミリーをすべて欠く MEF は、細胞老化を早期に逸脱するだけでなく、足場非依存的な増殖を契機に、nanog, sox2 など、幹細胞の自己複製能維持や腫瘍の足場非依存的増殖等に必要とされる遺伝子群を発現し始め、スフィアを形

成、免疫不全マウスの皮下において上皮細胞様の分化傾向を有する腫瘍を形成するという報告がなされた。すべての Rb ファミリーの失活は、例えば、マウスにおける網膜芽細胞腫発症に十分な条件である。一方、我々が見出した、甲状腺 C 細胞を悪性化するのに十分な Rb 複合変異の組み合わせは、おなじ変異を MEF に導入すると、やはり早期細胞老化逸脱を誘導した。このような細胞も、Rb ファミリーをすべて欠く MEF と類似した性質を示すことを見出した。Rb を再構成しても細胞周期に影響の出ない Rb 複合変異細胞株を選択し、Rb を再構成すると、このような細胞の stemness を示すと思われる表現型は、消失した。この現象の生物学的意義はなにか、Rb 機能と stemness は、どのようにしてつながるのか？これまでに知り得た Rb 機能との関連においてこの疑問を解こうとしている。また、Rb 複合変異マウス由来細胞をベースに、追加変異・ノックダウン等のインターベンションを加え、培養皿上（接着・メチルセルロース浮遊）で安定的に幹細胞様の挙動を表現するシステムの構築を目指している。正常の乳腺細胞において誘導した上皮間葉転換(EMT)が、創薬の標的として有効であることが報告されている。我々は、がん化のコンテキストで MEF において誘導される幹細胞様挙動の本態を明らかにし、それを創薬の標的として用いる可能性があるかを検討する。

4. RECK の制御するシグナル

Ras トランスフォーメーションに拮抗する遺伝子として単離した RECK 遺伝子の産物が、MMP-9, MT1-MMP, CD13/APN, ADAM10 等プロテアーゼの活性やマイクロドメイン局在を制御することを報告してきた。この分子の発現は、様々ながんの予後良性とよく相関する。しかし、なぜ Ras に拮抗するのかを明らかにしていなかった。HUVEC および MEF における RECK ノックダウンが細胞老化を誘導することを手がかりに、RECK が制御する細胞内シグナルを同定した。RECK が、HUVEC においては、MMP-2 依存的に $\beta 1$ -integrin シグナルを(Miki et al.)、MEF においては、MT1-MMP 依存的に EGFR シグナルを(Kitajima et al.)制御することを本年度報告することができた。残る課題は、RECK 蛋白質中に見出した 2 カ所の MMP 基質様ドメインが、MMP 活性阻害機能に必須であるかどうかを決定することである。

II. 研究業績

発表論文

研究室主体

Miki T, Shamma A, Kitajima S, Takegami Y, Noda M, Nakashima Y, Watanabe K, Takahashi C. The $\beta 1$ -integrin-dependent function of RECK in physiologic and tumor angiogenesis. Mol. Cancer Res. 2010 May;8(5):665-76.

Kitajima S, Miki T, Takegami Y, Kido Y, Noda M, Hara E, Shamma A, Takahashi C. Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs interferes with epidermal growth factor receptor signaling. Oncogene. 2010 Oct 4. [Epub ahead of print]

共同研究

Loayza-Puch F, Yoshida Y, Matsuzaki T, Takahashi C, Kitayama H, Noda M. Hypoxia and RAS-signaling pathways converge on, and cooperatively downregulate, the RECK tumor-suppressor protein through microRNAs. *Oncogene*. 2010 May 6;29(18):2638-48.

Chandana EP, Maeda Y, Ueda A, Kiyonari H, Oshima N, Yamamoto M, Kondo S, Oh J, Takahashi R, Yoshida Y, Kawashima S, Alexander DB, Kitayama H, Takahashi C, Tabata Y, Matsuzaki T, Noda M. Involvement of the Reck tumor suppressor protein in maternal and embryonic vascular remodeling in mice. *BMC Dev Biol*. 2010 Aug 6;10:84.

総説

Noda M, Takahashi C, Matsuzaki T, Kitayama H. What we learn from transformation suppressor genes: lessons from RECK. *Future Oncol*. 2010 Jul;6(7):1105-16.

北嶋俊輔、石川智夫、木戸敬治、高橋智聡 「その他腫瘍モデル」 完全版マウス・ラット疾患モデル活用ハンドブック 秋山徹、奥山隆平、河府和義編 p163- 180 羊土社

学会発表

Takahashi C, Shamma A. The Rb-Ras pathway in malignant progression. International Cancer Biology Symposium at National Sun Yat-Sen University 6月8日 (Kaohsiung, Taiwan)

高橋智聡 RB-RAS経路とがんの悪性進展 第3回 SYMPHONY 9月5日 (東京)

Shamma A, Takahashi C. ATM mediates the Rb-loss-induced DNA damage response and cellular senescence through chromatin remodeling and p16Ink4a regulation. 癌学会総会 9月24日 (横浜)

外部資金

高橋智聡：

科学研究費補助金 基盤 B 4,800 千円

2010 年度武田科学振興財団研究助成金 ビジョナリー 2,000 千円

内藤記念科学振興財団 奨励金 (研究助成) 3,000 千円

公益財団法人アステラス病態代謝研究会 平成 22 年度研究助成金 1,000 千円

Shamma Awad：

科学研究費補助金 基盤 C 2,200 千円

共同研究

鳥取大学医学部 岡崎俊朗博士 「in vitro がん幹細胞モデル系の開発に関する研究」

サンパウロ大学薬学部 Silvyia Stuchi Maria-Engler 博士 「RECK 機能の解析」

筑波大学人間総合科学研究科 島野仁博士 「Rb がん抑制遺伝子産物による脂肪代謝制御」